



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PIBIC

**Análise de proteínas LEA em sementes de mangaba (*Hancornia speciosa*
Gomes) submetidas ao armazenamento**

Área do conhecimento: Ciências Agrárias
Subárea do conhecimento: Tecnologia de sementes
Especialidade do conhecimento: Conservação de sementes nativas

Relatório Final
Período da bolsa: Agosto de 2017 a Julho de 2018

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC/CNPq

Orientador: Dra. Renata Silva-Mann
Autor: Laura Catharine Dória Prata Lima



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

SUMÁRIO

- 1. Introdução**
- 2. Objetivos**
- 3. Metodologia**
- 4. Resultados e discussões**
- 5. Conclusões**
- 6. Perspectivas**
- 7. Referências bibliográficas**
- 8. Outras atividades**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

1. Introdução

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), pertencente à família Apocynaceae, é uma espécie nativa brasileira que apresenta seu germoplasma ameaçado devido à fragmentação das áreas naturais (SILVA et al., 2017) e do extrativismo não sustentável. Ela pode ser encontrada nas regiões Centro-oeste, Sudeste e Nordeste, onde o estado de Sergipe é o maior produtor. O fruto da mangabeira, a mangaba, é muito consumida na forma de sucos, doces, geleias, sorvetes e licores devido a suas características organolépticas e seu elevado valor nutricional (ALMEIDA et al., 2011).

A principal forma de produção é por meio do extrativismo, onde muitas vezes os frutos são retirados completamente, fato que reduz a possibilidade de formação de novos indivíduos nessas áreas. Outro problema observado é a perda da vegetação nativa, devido ao avanço da monocultura e da ocupação imobiliária, que favorece a redução de indivíduos na área de ocorrência natural e a perda da diversidade genética desta espécie.

Diante do exposto, uma das alternativas para assegurar a sobrevivência da espécie é a conservação *ex situ*. No entanto, a propagação da mangabeira ocorre principalmente por sementes, que por serem recalcitrantes perdem rapidamente a sua viabilidade (SANTOS et al., 2010). Desta forma, é necessário submetê-las à germinação imediata após a coleta de frutos para assegurar a sua germinação, e por esta razão não podem ser armazenadas por longos períodos (TAVARES, 1990). Assim, o estudo quanto à manutenção da viabilidade de sementes durante o armazenamento é uma das estratégias para



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

a conservação da espécie, que podem ser usadas na produção de mudas para a recuperação das áreas degradadas.

O principal problema no armazenamento das sementes recalcitrantes é a impossibilidade de desidratação e armazenamento à baixas temperaturas, necessários para manutenção da qualidade e vigor de sementes. De acordo com Tompsett et al. (1985), as sementes recalcitrantes devem ser armazenadas em meio osmótico, com ou sem adição de inibidores de germinação, como o ácido abscísico (ABA) que pode induzir tolerância à dessecação retardando o metabolismo (TOMPSETT, 1985; BRUGGINK & VAN DER TOORN, 1995).

Quando as sementes recalcitrantes estão hidratadas (com alto teor de umidade) permanecem com respiração e metabolismo ativos durante o período de armazenamento, ou seja, há síntese de proteínas. O elevado teor de água faz com que as sementes recalcitrantes permaneçam viáveis (VERTUCCI, 1995). Desta forma, é de fundamental importância o conhecimento da tolerância à dessecação das sementes da mangaba por meio do acúmulo de proteínas do tipo LEA (*Late Embryonic Abundant Proteins*), uma vez que, estas proteínas controlam a taxa de perda de água e estabilizam estruturas intracelulares em situações de estresse, e também inibem a desnaturação de macromoléculas.

2. Objetivo

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade de sementes durante diferentes períodos de armazenamento em soluções osmoprotetoras, verificar a possibilidade de uso de sequências gênicas desenhadas para *Arabidopsis* para avaliar e futuramente verificar o nível de expressão destas, e monitorar a viabilidade das sementes comparando os valores de germinação (viabilidade) com a análise de proteínas expressas nos últimos estádios de desenvolvimento (*Late Embryogenesis Abundant* – LEA).



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

3. Metodologia

Frutos maduros de mangabeira (fruto com casca amarelada a avermelhada, estrias avermelhadas e com textura macia) foram beneficiados manualmente. As sementes obtidas foram lavadas e postas para secar em condição ambiente (25°C) por 24 horas. Após esse período foi retirada uma alíquota do lote de sementes e procedeu-se com a avaliação da qualidade inicial do lote de sementes por meio da determinação do teor de água, condutividade elétrica, germinação, qualidade e integridade do ácido ribonucleico - RNA.

A porção restante de sementes foi subdividida em sachês, contendo 500 sementes. Os sachês foram acondicionados em recipientes de vidro contendo quatro diferentes soluções osmocondicionantes com potencial de -0,8 MPa, sendo A, B (com adição de fungicida natural), C (com adição de fungicida comercial) e D (com adição de fungicida comercial). Em cada recipiente foram postas 2.000 sementes, sendo armazenado um total de 8.000 sementes, mantidas em B.O.D. com temperatura de 10°C. Aos 50, 100, 150 e 200 dias de armazenamento as sementes foram submetidas às mesmas avaliações para determinação da qualidade inicial.

3.2 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água foi realizada pelo método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 horas, em duplicata de 10 g, de acordo com as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido.

3.3 Condutividade elétrica



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

O teste foi realizado com 8 repetições de 25 sementes, pesadas e colocadas em 75 mL de água ultrapura, mantidas em incubadora do tipo B.O.D. a 25°C por 24 horas. Os valores de condutividade elétrica foram obtidos e expressos em $\mu\text{S cm g}^{-1}$ (BRANDÃO JUNIOR et al., 1997).

3.4 Germinação

No teste de germinação as 8 repetições de 25 sementes foram distribuídas em rolo de papel tipo germitest, umedecido com 2,5 vezes o peso seco dos papéis em água destilada e mantidas em incubadora do tipo B.O.D. a 25°C, com fotoperíodo de 12h. No vigésimo quinto dia realizou-se a primeira contagem e a última aos trinta e cinco dias após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

3.5 Extração de RNA e avaliação da integridade do RNA

O RNA foi extraído de embriões de sementes de mangaba antes do armazenamento e após serem armazenadas em soluções osmocondicionantes por diferentes períodos usando o kit comercial Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante. Para o controle, foram utilizadas sementes que não haviam sido armazenadas. A integridade, qualidade e quantidade de RNA extraído foram avaliadas por meio de nanospectrofotometria a 260, 230 e 280 nm. Para avaliar a integridade do RNA, 1 μg de RNA das sementes não armazenadas (QI) e das sementes armazenadas pelo período de 50 dias, foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 1,0%, corado com prata e visualizado em transiluminador de luz branca.

3.6 Delineamento e análise estatística



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com parcelas subdivididas, sendo 4 parcelas soluções osmocondicionantes: A, B, C e D e 4 subparcelas períodos de armazenamento: 50, 100, 150 e 200 dias. As variáveis analisadas foram testadas quanto à distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, quando necessário os resultados foram transformados de acordo com o tipo de variável utilizada. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F, regressão e comparação de médias (Tukey) ao nível de 5% de probabilidade.

3.7 Análise de sequência gênica em PCR convencional

A análise de correspondência das sequências gênicas de *Arabidopsis thaliana* (*sHSP18.2* e *EM6*) em genótipos de *Hancornia speciosa* Gomes, previamente relacionadas à tolerância à dessecação, foi realizada por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) convencional. A reação de PCR foi constituída de temperatura inicial de 94°C por 5 min., seguida por 35 ciclos que envolvem temperaturas de 94°C por 1 min., 52°C por 1 min. e 72°C por 1 min, para finalizar foi realizada uma extensão final a 72°C por 10 min. Os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Afim de validar a reação, foi realizada essa mesma reação com duas espécies arbóreas, *Erithryna velutina* Willd. e *Schinus terebinthifolius* Raddi., sendo a primeira típica ortodoxa e a última de caráter intermediário.

Para análise de proteínas LEA em sementes submetidas ao armazenamento, estas foram mantidas em diferentes soluções osmóticas: A e B (com fungicida natural), C e D (ambas com fungicida comercial). Uma amostra de sementes de cada tratamento foi retirada aos 0, 50, 100, 150 e 200 dias para a análise de proteínas LEA utilizando o método SDS-PAGE, seguindo as recomendações de Blackman et al. (1991). Para cada tratamento 150 mg de



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

cotilédones foram macerados em 1 ml de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 500 mM; MgCl₂ 5 mM; PMSF 1 mM). As amostras foram agitadas durante um minuto e centrifugadas a 4°C, a 16.000 xg durante 30 minutos. Após, o sobrenadante foi incubado em banho-maria a 70°C por 15 minutos, a operação anterior foi repetida visando melhor qualidade.

3.8 Quantificação de proteínas

As determinações de proteínas foram realizadas pela adição de 5 µl de amostra em 195 µl de reagente de Bradford. As amostras reagiram por 5 min. à temperatura ambiente (25°C) e a absorbância da amostra foi medida a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas (Epoch™).

4. Resultados e Discussão

4.1 Qualidade inicial

Para a avaliação da qualidade inicial das sementes de mangaba, obteve-se teor de água de 55,6% e 78% de germinação, o comprimento da parte aérea, raiz e a massa seca de plântulas foram 5,92 cm, 10,26 cm e 89,259 mg por plântula, respectivamente. A condutividade elétrica correspondeu a 10,0 µS cm g⁻¹.

A concentração do RNA obtido a partir de embriões das sementes foi de 55,5 ng µl⁻¹ e para a qualidade obtida pela relação de A₂₆₀/A₂₈₀ verificou-se 1,457. Apesar destas informações não serem obtidas por meio de um método de avaliação da qualidade de sementes, podem ser utilizadas como um indicativo de que as sementes estão viáveis uma vez que o RNA é uma molécula sensível às alterações que ocorrem nas sementes quando estão em processo de deterioração.

Salienta-se que a qualidade das sementes está associada a atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, essas informações são determinantes para a tomada de decisão na



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

escolha do lote a ser conservado no armazenamento e/ou utilizado na produção de mudas, nesta perspectiva, considerando os resultados obtidos, o lote apresenta potencial para o armazenamento.

4.2 Armazenamento

Para as sementes armazenadas, foi verificado o efeito entre as soluções osmocondicionantes e os períodos de armazenamento para a condutividade elétrica, o comprimento da raiz e massa seca de plântulas, o mesmo não ocorreu para o teor de água, comprimento da parte aérea e o percentual de germinação. Nestas últimas variáveis foi verificado o efeito para o tempo (TABELA 1).

TABELA 1. Resumo da Análise de Variância (ANAVA) para a avaliação do teor de água (TA), condutividade elétrica (CE), germinação (%G), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca de plântulas (MSP) de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) armazenadas por diferentes períodos em soluções osmocondicionantes.

FV	GL	TA (%)	G (%)	CPA (cm)	CR (cm)	MSP (g)	CE ($\mu\text{S}/\text{cm g}^{-1}$)
Solução	3	68,89 ^{ns}	0,038 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,19 ^{ns}	7,27 ^{ns}	137,09 ^{ns}
Tempo	3	8,44 ^{ns}	4,05 [*]	12,59 [*]	27,01 [*]	538,01 [*]	3754,79 [*]
S*T	9	12,14 ^{ns}	0,009 ^{ns}	0,20 [*]	0,27 ^{ns}	7,09 [*]	64,13 [*]
Média		57,71	14,44	1,52	1,77	34,38	23,05
CV 1 (%)		6,03	72,91	37,08	24,86	59,75	23,05
CV 2 (%)		4,79	27,08	13,26	20,48	30,15	6,74

* Significativo e ns - não significativo a 5% ($p < 0,05$).

Para o teor de água das sementes não houve efeito das diferentes soluções osmocondicionantes durante o período de armazenamento e as soluções foram capazes de manter o teor de umidade acima de 50% para todos os períodos de armazenamento, sendo Solução A (59,66%), B (53,32%), C (59,19%) e D (58,67%). O alto teor de água observado é característico das sementes recalcitrantes, pois não sofrem secagem na planta mãe e são liberadas para o ambiente com alto teor de água (ROBERTS, 1973).



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

A manutenção do teor de água nas sementes durante o armazenamento é uma das condições necessárias para que permaneçam viáveis, pois reduz a possibilidade de danos físicos na semente decorrentes da desidratação. Esse dano refere-se a alterações na estrutura dos vacúolos que são proeminentes nas sementes recalcitrantes, ao citoesqueleto e as membranas celulares, ocasionando a falta de suporte intracelular e organização estrutural que culminam na perda de viabilidade das sementes (FARRANT et al., 1992; FARRANT et al., 1997).

No armazenamento de sementes de pitombeira (*Talisia esculenta* (A. St. Hil)), de comportamento recalcitrante assim como as de mangaba, verificou-se redução no teor de água de 40 a 24% no 15º dia do armazenamento, ocasionando redução da taxa de germinação (SENA et al., 2016).

O menor teor de água que mantém a viabilidade das sementes recalcitrantes varia muito em função das espécies, a exemplo para *Theobroma cacao* que o menor teor de água seguro corresponde a 23%, enquanto que para *Avicennia marina* é de 61,5% (MUMFORD; BRETT 1982; FARRANT et al., 1996). Para sementes de mangaba teor de água correspondente a 43% não prejudica a germinação, enquanto que para teor de água de 38% ocorre decréscimo gradativo da germinação (SANTOS et al., 2010).

Mesmo com a manutenção do teor de água nas sementes, o aumento do período de armazenamento ocasionou redução do percentual de germinação independente da solução osmocondicionante utilizada, ocorrendo um decréscimo na germinação de 37% aos 50 dias e 86% para 100 dias quando comparado com a germinação obtida para a qualidade inicial. A partir de 130 dias não foi possível a manutenção da viabilidade das sementes (FIGURA 1).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

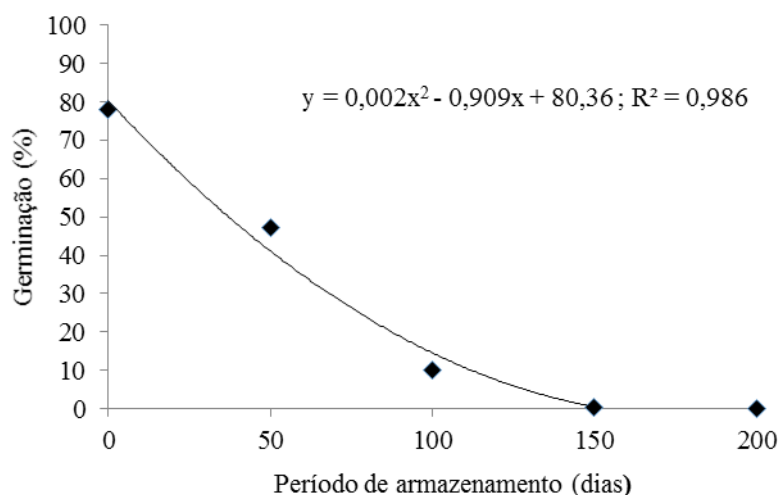


FIGURA 1. Germinação de sementes de mangaba (*Hancornia speciosa*) armazenadas por diferentes períodos.

No período de 100 dias foi observada a presença de micro-organismos nas sementes de mangaba, o que ocasionou redução da qualidade. Aos 150 e 200 dias a incidência de fungos foi acentuada, resultando na morte de todas as sementes. Cabe salientar que as soluções C e D continham em sua formulação fungicidas comerciais nas doses recomendadas.

O percentual de germinação para sementes recalcitrantes armazenadas varia em função da espécie, que podem apresentar 5% no 10º dia conforme verificado para *Aquilaria malaccensis* Lamk (TABIN; SHRIVASTAVA, 2015), 99% para *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. no 18º dia (CHARLOQ et al., 2016) e 64% aos 180 dias de armazenamento para *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (GARCIA et al., 2014). Para sementes de mangaba, Freitas (2016) obteve 81 e 18% para o armazenamento durante 60 e 90 dias, valores semelhantes aos obtidos neste estudo.

O decréscimo da germinação em função dos períodos de armazenamento é resultante da alta incidência de fungos que aceleram os processos deteriorativos decorrente dos danos



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

que afetam estas sementes durante o armazenamento, principalmente metabólicos, devido à alta taxa respiratória e do metabolismo. Fatores macro e micromoleculares podem ocorrer durante o armazenamento e afetam a viabilidade das sementes (PAMMENTER; BERJAK, 2000).

Outro agravante que pode contribuir para que processos deteriorativos e oxidativos ocorram nas sementes de mangaba, é a presença de maior teor de lipídeos na sua composição química (teor de óleo $27,33 \pm 0,37\%$, proteínas $12,10 \pm 1,60\%$, fibras $11,98 \pm 0,46\%$, celulose 17,07, hemicelulose 22,57 e lignina 10,16%), considerando que estes apresentam maior instabilidade química e podem ocasionar deterioração mais rápida do que para as sementes amiláceas ou protéicas, por meio das reações hidrolíticas formando o hiperóxido (SANTOS et al., 2015; HARRINGTON, 1972).

A alta taxa metabólica leva a atividade descontrolada de radicais livres, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a peroxidação lipídica, resultando em danos à membrana e a geração de subprodutos tóxicos e dano oxidativo ao DNA, situação que se agrava devido a falha do sistema de reparação nas células culminado na perda da viabilidade das sementes (FINCH-SAVAGE; PRAMANIK; BEWLEY, 1994; MCDONALD, 1999; VARGHESE et al., 2011).

Para o comprimento da parte aérea, raiz e a massa seca de plântulas, verificou-se que as sementes armazenadas nas soluções B e C apresentaram os maiores valores quando armazenadas no período de 100 dias, enquanto que aquelas armazenadas nas soluções A e D apresentaram plântulas menores e com menor massa. Nos demais períodos de armazenamento não houve diferenças entre as soluções osmocondicionantes (TABELA 2).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

TABELA 2. Desdobramento da solução dentro dos diferentes períodos de armazenamento para as variáveis comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR) e massa seca de plântulas (MSP).

Período de armazenamento (dias)	Soluções osmocondicionantes -0,8MPa			
	A	B	C	D
Comprimento da parte aérea (cm)				
50	4,43 ab	5,22 a	3,88 ab	2,92 b
100	1,78 b	3,08 a	3,60 a	1,95 b
150	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
200	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Comprimento da raiz (cm)				
50	7,77 a	7,60 a	6,17 a	6,58 a
100	3,13 b	5,49 a	5,80 a	3,96 b
150	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
200	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Massa seca de plântulas (mg/plântula)				
50	78,18 a	75,00 a	77,69 a	73,36 a
100	45,00 b	80,75 a	77,00 a	43,25 b
150	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
200	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Estes resultados indicam que é possível armazenar as sementes de mangaba, contudo, haverá redução no vigor destas sementes durante o armazenamento, sendo que no período de 50 dias foram observados os valores mais próximos daqueles obtidos para a qualidade inicial em todas as soluções e aos 100 dias as soluções B e C possibilitaram a formação de plântulas mais vigorosas.

O vigor das sementes pode ser entendido como a junção das propriedades que determinam o nível potencial de atividade e desempenho de uma semente ou de um lote (ISTA, 1981), sendo influenciado dentre outros, por fatores genéticos intrínsecos a sementes, condições ambientais durante a formação de sementes, danos mecânicos, micro-organismos, insetos e condições ambientais durante o armazenamento, nesse último, a umidade e a temperatura são os aspectos mais relevantes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Assim, considerando que o teor de umidade das sementes controla os diferentes processos metabólicos e a temperatura afeta a velocidade dos processos bioquímicos, a redução do vigor das sementes armazenadas verificada neste estudo, pode estar associada



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

com sua alta atividade metabólica e taxa respiratória que leva a um consumo considerável de material de reserva e decréscimo da energia da semente, que apesar de se encontrarem em baixa temperatura, foi agravado pela presença de micro-organismos.

Para a avaliação da condutividade elétrica em diferentes soluções osmocondicionantes em função dos períodos de armazenamento, verificou-se que no período de 50 dias os maiores valores de condutividade foram observados para sementes das soluções A e D e aos 200 dias na solução A (TABELA 3).

TABELA 3 Desdobramento da solução dentro dos diferentes períodos de armazenamento para a condutividade elétrica (CE).

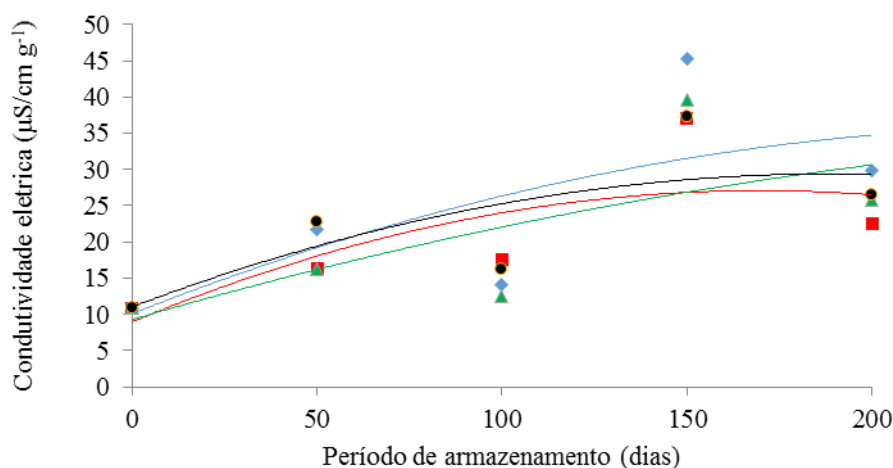
Período de armazenamento (dias)	Soluções osmocondicionantes -0,8MPa			
	A	B	C	D
Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm g}^{-1}$)				
50	21,68 a	16,32 b	16,21 b	22,73 a
100	14,14 ab	17,59 a	12,42 b	16,30 ab
150	45,29 a	37,10 b	39,67 b	37,24 b
200	29,87 a	22,43 b	25,83 ab	26,53 ab

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

As soluções B e C aos 50 dias apresentaram os menores valores para a condutividade elétrica, indicando menor deterioração das sementes armazenadas nestas soluções, uma vez que a condutividade elétrica está associada a presença de exsudados na solução, sendo verificada maior quantidade quando as sementes apresentam maior grau de deterioração. Os valores para a condutividade são semelhantes aos obtidos por Freitas (2016) para o



armazenamento de sementes de mangaba, com condutividade elétrica de $17,74 \mu\text{S cm g}^{-1}$ para 60 dias de armazenamento. Analisando a condutividade elétrica das sementes armazenadas nos diferentes períodos e soluções osmocondicionantes, verifica-se resposta quadrática em função dos crescentes períodos de armazenamento (FIGURA 4).

FIGURA 4. Condutividade elétrica das sementes armazenadas em diferentes soluções osmocondicionantes e períodos de tempo.

No período de 50 dias, foram observados valores da condutividade elétrica variando de 16,21 (Solução C) a $22,7 \mu\text{S cm g}^{-1}$ (Solução D), sendo as soluções B e C aquelas com valores mais próximos dos obtidos para a qualidade inicial, indicando a manutenção da



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

integridade das membranas e manutenção da viabilidade das sementes, que no teste de germinação formaram plântulas com a parte aérea variado de 2,92 (Solução D) a 5,22 cm (Solução B) e comprimento de raiz variando entre 6,17 (Solução A) e 7,77 cm (solução C).

Conforme se ampliou o período de armazenamento ocorreu o aumento da condutividade elétrica. Esse aumento é verificado pela maior liberação de exsudados das sementes caracterizando o início do processo de deterioração pela desestruturação do sistema de membranas celulares culminando na redução da viabilidade (SANTOS et al., 2005), o que corrobora com os resultados obtidos para a germinação, comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e massa seca de plântulas, que reduziram conforme aumentaram os períodos de armazenamento.

Percebe-se que mesmo não prolongando o período de armazenamento, quando comparada com as outras soluções, as soluções osmocondicionantes B e C apresentaram os menores valores de condutividade elétrica e plântulas maiores e mais pesadas, sendo promissoras para o armazenamento de sementes de mangaba, embora em períodos curtos quando comparados com sementes ortodoxas, são suficientes para não exigir a semeadura de todo o lote de sementes imediatamente após sua colheita e, portanto, uma opção para conservação das sementes.

4.3 Qualidade e integridade do RNA

Para as sementes armazenadas em todas as soluções osmocondicionantes foi verificada redução da concentração do RNA conforme ampliou-se o período de armazenamento (FIGURA 5). Essa redução está associada aos danos mecânicos, metabólicos e macromoleculares que as sementes sofreram durante o armazenamento, que culminaram na perda da viabilidade das mesmas.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

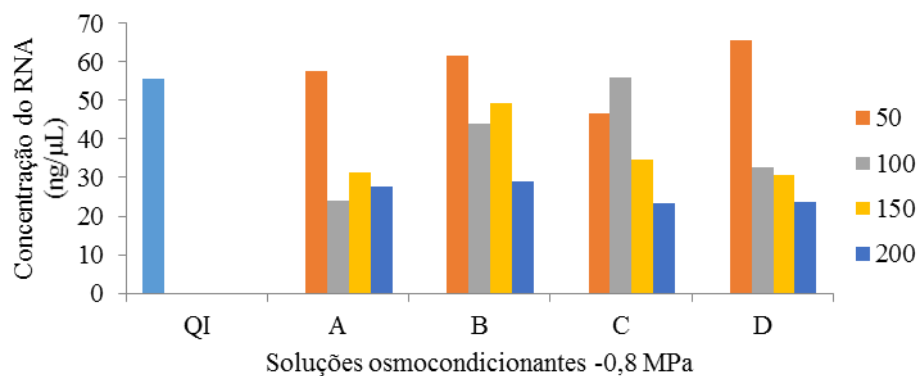


FIGURA 5. Concentração do RNA de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes antes do armazenamento (QI) e quando armazenadas em diferentes soluções osmocondicionantes (A, B, C e D) e períodos (50, 100, 150 e 200 dias).

A redução da concentração do RNA corrobora com os resultados obtidos para a germinação, comprimento da parte aérea e raiz e massa seca de plântulas, que também decresceram conforme os períodos de armazenamento foram aumentando. Verifica-se ainda maior concentração de RNA no período de 50 dias. Ressalta-se que para esse período foram observadas plântulas maiores e mais vigorosas para todas as soluções.

Considerando que o RNA é uma molécula sensível ao processo oxidativo desencadeado quando as sementes estão sob estresse, a avaliação da integridade e qualidade do RNA nas sementes armazenadas pode contribuir para identificar o nível de dano que ocorreu nas sementes.

Para a qualidade do RNA, verificada por meio da razão 260/280, a solução B permitiu a manutenção da qualidade durante todo o período de armazenamento, enquanto que para as soluções A e D verificou-se redução a partir do período de 100 dias, e para a solução C essa redução foi observada a partir de 150 dias (FIGURA 6).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

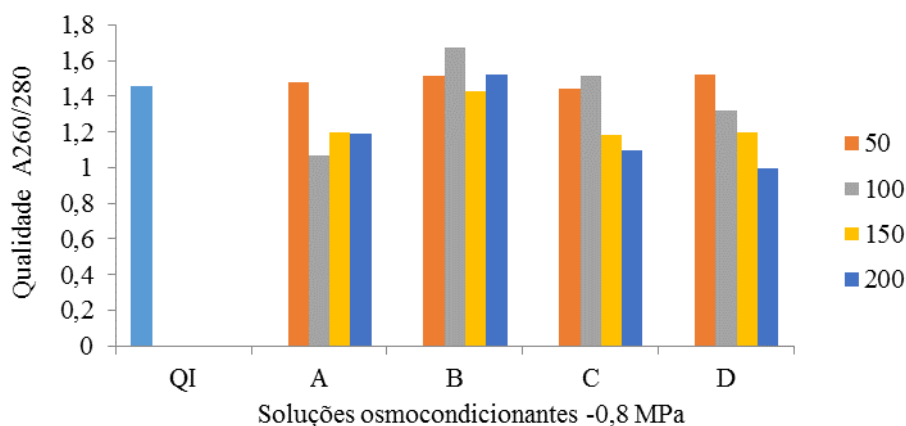


FIGURA 6. Qualidade do RNA de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes antes do armazenamento (QI) e quando armazenadas em diferentes soluções osmocondicionantes (A, B, C e D) e períodos (50, 100, 150 e 200 dias).

As informações obtidas para a qualidade do RNA estão em acordo com as verificadas para as análises anteriores, visto que indicam redução da qualidade do RNA em função dos crescentes períodos de armazenamento. Para as soluções B e C nos períodos de 50 e 100 dias verificou-se maior qualidade do RNA e também menores valores de condutividade elétrica, cabe destacar que houve germinação apenas para estes períodos.

Quanto ao gel de integridade, verificou-se que tanto as sementes que não foram armazenadas quanto aquelas armazenadas por 50 dias, independente da solução de armazenamento, apresentaram as bandas de 18 e 28s, indicando a presença de RNA não degradado no material (FIGURA 7).



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

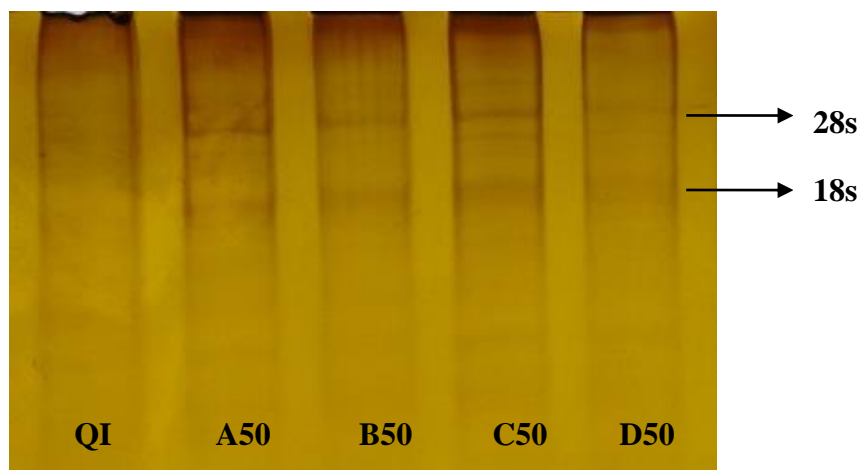


FIGURA 7. Gel de integridade do RNA de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes antes do armazenamento (QI) e quando armazenadas em diferentes soluções osmocondicionantes (A, B, C e D) por 50 dias.

Os danos em nível molecular ocorreram em menores proporções, entretanto, os demais tipos de danos foram suficientes para comprometer a viabilidade das sementes, sendo importante buscar estratégias para minimizá-los visando otimizar o período de armazenamento. Cabe destacar que a presença de RNA nas sementes é normalmente estudada durante a germinação, contudo, especificamente para as sementes de mangaba, foi possível estabelecer uma relação com a viabilidade das sementes durante o armazenamento.

4.4 Análise de sequência gênica em PCR convencional

Houve amplificação para as sequências gênicas envolvidas na tolerância a estresses (*sHSP18.2* e *EM6*) descritas para *Arabidopsis thaliana* para todas as três espécies avaliadas. Este fato comprova que há homologia para as sequências usadas e que o DNA apresentava boa qualidade.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

A presença de sequências gênicas relacionadas a HSP (*sHSP18.2*) (Figura 8), inclusive em *H. speciosa*, implica que estas espécies podem expressar a produção dessas proteínas.

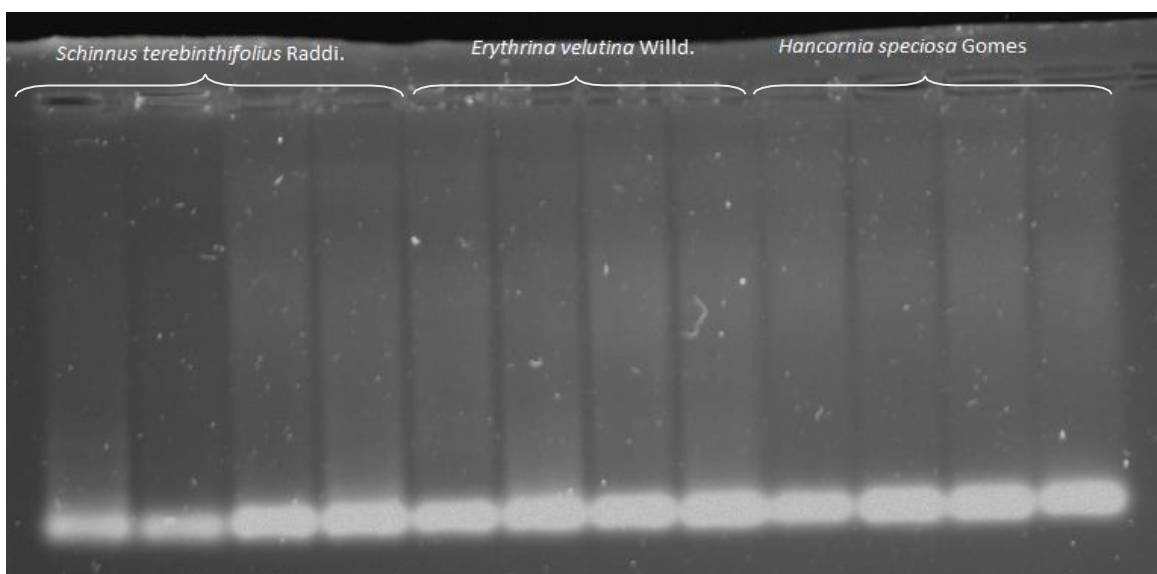


FIGURA 8. Gel de Agarose a 1% de fragmentos amplificados de DNA de *Hancornia speciosa* Gomes, *Erythrina velutina* Willd., *Schinus terebinthifolius* Raddi., com primer desenhado para *Arabidopsis thaliana*, *sHSP18.2*. UFS, São Cristóvão-SE, 2017.

Para o gene *EM6* (Figura 9) o padrão de bandas foi diferente para *H. speciosa*, quando comparado com as espécies *S. terebinthifolius* (espécie que apresenta tolerância intermediária à dessecação) e *E. velutina* (sementes ortodoxas).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

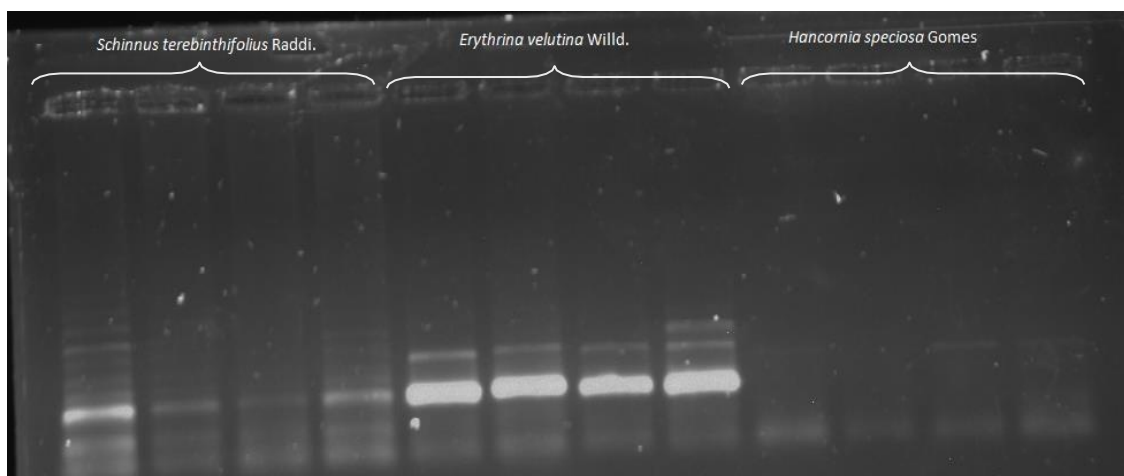


FIGURA 9. Gel de Agarose a 1% de fragmentos amplificados a partir de DNA de *Hancornia speciosa* Gomes com primer desenhado para *Arabidopsis thaliana*, para a sequência gênica *EM6*. UFS, São Cristóvão-SE, 2017.

4.5 Quantificação de Proteínas

A determinação da concentração de proteínas extraídas de amostras de cotilédones de mangaba foi realizada a partir da comparação dos resultados com diferentes valores de concentração ($0,367 \text{ mg ml}^{-1}$, $0,408 \text{ mg ml}^{-1}$, $0,502 \text{ mg ml}^{-1}$ e $0,640 \text{ mg ml}^{-1}$) de albumina do soro bovino (BSA) (FIGURA 10). Quanto maior as concentrações de proteínas expressas mais interferentes, como compostos fenólicos, pigmentos ou proteínas degradadas pelo processo de extração, irão influenciar na eficiência de separação das amostras em gel de eletroforese.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

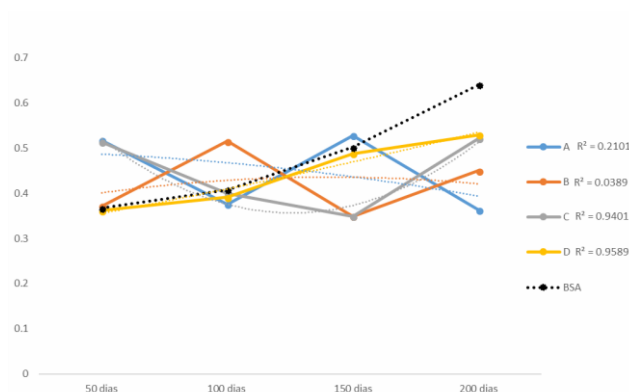


FIGURA 3. Concentração de proteínas em cotilédones de sementes de *Hancornia speciosa* durante 50, 100, 150 e 200 dias de armazenamento em quatro soluções osmoprotetoras (A, B, C, D e E). UFS, São Cristóvão- SE, 2018.

Durante os primeiros 50 dias de armazenamento, as sementes acondicionadas nas soluções A ($0,517 \text{ mg ml}^{-1}$) e C ($0,513 \text{ mg ml}^{-1}$) apresentaram altos níveis de concentração de proteínas, sendo estes valores próximos aos encontrados nos cotilédones utilizados como controle - testemunha ($0,531 \text{ mg ml}^{-1}$), ou seja, em sementes que não foram armazenadas. A perda de água das sementes induz elevação da produção de proteínas, como forma de proteção de membranas para possíveis processos relacionados à deterioração. Dessa forma, as soluções A e C podem apresentar maior controle para a perda ou absorção de água pelas sementes, durante o armazenamento. Entretanto, após 50 dias houve um decréscimo significativo na produção de proteínas em ambos os tratamentos.

A solução B manteve a concentração de proteínas ($0,515 \text{ mg ml}^{-1}$) durante 100 dias de armazenamento, sendo este o melhor tratamento quando comparado aos demais. No entanto, as proteínas apresentaram decréscimo



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

significativo após esse período, o que pode estar relacionado à possível perda da integridade de membranas das sementes. Sementes acondicionadas na solução D apresentaram acréscimos na concentração das proteínas até 100 dias. O decréscimo da concentração após 150 dias de armazenamento pode ter sido influenciado pela perda de água pelas sementes (FONSECA; FREIRE 2003), que ocasiona a ruptura mecânica, tanto da estrutura citoplasmática quanto da membrana celular, resultando na degradação celular (TAIZ; ZEIGER 2004).

A quantificação das proteínas se torna uma atividade essencial quando se pretende entender o comportamento de sementes durante o armazenamento, pois as proteínas, como as LEA, apresentam papel fundamental na proteção da estrutura de membranas celulares (POMPELLI, 2017).

5. Conclusão

Sementes acondicionadas na solução D continuam a aumentar a concentração de proteínas até 200 dias, o que permite inferir que até 100 dias as sementes permaneceram vivas expressando proteínas LEA.

Sementes de *H. speciosa* podem ser conservadas por 50 dias.

A solução B possibilitou maior percentual médio de germinação e manutenção da integridade e qualidade do RNA.

6. Perspectivas

É importante avaliar a expressão de sequências gênicas relacionadas à tolerância à dessecação, por meio de estudos com expressão gênica por meio da técnica de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real). Estas atividades já foram iniciadas e ajustes metodológicos estão sendo realizados.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

7. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, M.M.B.; SOUSA, P.H.M.; ARRIAGA, A.M.C.; PRADO, G.M.; MAGALHÃES, C.E.C.; MAIA, G.A.; LEMOS, T.L.G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, 44: 2155-2159, 2011.

BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. **Plant Physiology**, 96 (3): 868-874, 1991.

BRANDÃO JÚNIOR, D. S., RIBEIRO, D., BERNADINO FILHO, J. R., & VIEIRA, M. Adequação do teste de condutividade elétrica para determinar a qualidade fisiológica de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 7, n. 1/2, p. 184, 1997.

BRASIL. RAS - **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2009. 399p.

BRUGGINK, T.; VAN DER TOORN, P. Induction of desiccation tolerance in germinated seeds. **Seed Science Research**, 5:1-4. 1995.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. FUNEP: Jaboticabal, 2012. 590p.

CHARLOQ, Z. L.; SIREGAR, T. H.; DAMANIK, S. B.; YAZID, A.; HUSNI, M. Physiology Changes of Shelled Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Seed after 16 days storage with PEG 6000 30% coating to induce secondary dormancy. **Journal of Agronomy**, v. 15, p. 11-18, 2016.

DELAHAIE, J.; HUNDERTMARK, M.; BOVE, J.; LEPRINCE, O.; ROGNIAUX, H.; BUITINK, J. LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 64: 4559-4573, 2013.

FARRANT, J. M., PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Development of the recalcitrant (homoiohydrous) seeds of *Avicennia marina*: anatomical, ultrastructural and biochemical events associated with development from histodifferentiation to maturation. **Annals Botany**, v. 70, p. 75-86, 1992.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; FARNSWORTH, E. J.; VERTUCCI, C. W. Presence of dehydrin-like proteins and levels of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat. **Seed Science Research**, v. 6, p. 175-182, 1996.

FARRANT, J. M., PAMMENTER, N. W., BERJAK, P.; WALTERS, C. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. *Seed Science Research*, v. 7, p. 135-144, 1997.

FINCH-SAVAGE, W. E., PRAMANIK, S. K. AND BEWLEY, J. D., The expression of dehydrin proteins in desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of temperate trees. **Planta**, v. 193, p. 478-485, 1994.

GARCIA, C.; COELHO, C. M. M.; MARASCHIN, M.; OLIVEIRA, L. M. de . Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 4, p. 857-867, 2014.

HARRINGTON, J. F. Seed storage longevity. In: **Seed Biology**, v. 3, ed.

KOZLOWSKI, T. T. (New York: Academic Press), p. 145-245, 1972.

INTERNATIONAL RULES FOR SEED TESTING. **Seed Science and Technology**. Zurichstr. 50, edition, 2009. ISTA, 1981

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, v. 27, p. 177-237, 1999.

MUMFORD, P.M.; BRETT, A. C. Conservation of cacao seed. **Tropical Agriculture** Trinidad, v. 59, p. 306-310, 1982.

PAMMENTER; BERJAK, 2000

POMPELLI, M.F. Práticas Laboratoriais em Biologia Vegetal. Recife: Editora da Universidade Federal de Pernambuco, 2017, 235 p.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 3, p. 499-514, 1973.

ROSA, S.D.V.F.; PINHO, E.R.V.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, 27 (2): 91-101, 2005.

SANTOS, S. R. G.; PAULA, R. C. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Bail.) Smith e Downs (branquilho) - Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 136-145, 2005.

SANTOS, P. C. G.; ALVES, E. U.; GUEDES, R. S.; SILVA, K. B.; ALMEIDA CARDOSO, E.; LIMA, C. R. Quality of *Hancornia speciosa* Gomes seeds in function of drying periods. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 343-352, 2010.

SANTOS, R. M.; SANTOS, A. O.; SUSSUCHI, E. M.; NASCIMENTO, J. S.; LIMA, Á. S.; FREITAS, L. S. Pyrolysis of mangaba seed: Production and characterization of bio-oil. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 43-48, 2015.

SANTOS, P.C.G.S.; ALVES, E.U., GUEDES, R.S.; SILVA, K.B.; CARDOSO, E.A.; LIMA, C.R. Qualidade de sementes de *Hancornia speciosa* Gomes em função do tempo de secagem. **Semina: Ciências Agrárias**, 31: 343-352, 2010.

SENA, L. H. de M.; MATOS, V. P.; MEDEIROS, J. É. D.; SANTOS, H. H. D.; ROCHA, A. P.; FERREIRA, R. L. C. Storage of pitombeira seeds [*Talisia esculenta* (A. St. hil) Radlk - Sapindaceae] in different environments and packagings. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 40, n. 3, p. 435-445, 2016.

SILVA, A.V.; AMORIM, J.A.E.; MELO, M.F.V.; LÉDO, A.S.; RABBANI, A.R.C. Genetic diversity of remaining populations of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) in Restingas of Brazil. **Journal of Agricultural Science**, 9 (2): 46-52, 2017.

TABIN, T.; SHRIVASTAVA, K.; SHUKLA, A. K. Distribution and diversity of AM fungi in the rhizospheric soils of naturally and artificially growing *Aquilaria malaccensis* Lamk. Trees in arunachal Pradesh and Assam states of earth east India. **Indian Journal of Hill Farming**, Umiam, v. 27, n. 2, p. 38-40, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3a ed. Artmed, Porto Alegre. 2004.

TAVARES, S. Estudos sobre emergência de sementes de mangaba, *Hancornia speciosa* Gomes. **Arquivos do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, 5: 193-199, 1960.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

TOMPSETT, P.B. The influence of moisture content and storage temperature on the viability of *Shorea almon*, *Shorea robusta*, and *Shorea roxburghii* seed. **Canadian Journal of Forest Research**, 15:1074-1079, 1985.

VARGHESE, B.; BERJAK, P.; VARGHESE, D.; PAMMENTER, N. W. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. **Plant Physiology**, v. 142, p. 326-338, 2011.

VERTUCCI, C.W. Calorimetric studies of the state of water in seed tissues. **Biophysical Journal**, 58: 1463-1471, 1990.

VERTUCCI, C.W; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In J Kigel, G Galil, eds, *Seed Development and Germination*. Marcel Dekker, New York, pp 237–272.